

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

IN RE APPLICATION OF: Yuji HATADA, et al.

GAU:

SERIAL NO: NEW APPLICATION

EXAMINER:

FILED: Herewith

FOR: ALKALINE PROTEASES



REQUEST FOR PRIORITY

ASSISTANT COMMISSIONER FOR PATENTS  
WASHINGTON, D.C. 20231

SIR:

- ☐ Full benefit of the filing date of U.S. Application Serial Number , filed , is claimed pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §120.
- ☐ Full benefit of the filing date of U.S. Provisional Application Serial Number , filed , is claimed pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §119(e).
- ☒ Applicants claim any right to priority from any earlier filed applications to which they may be entitled pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §119, as noted below.

In the matter of the above-identified application for patent, notice is hereby given that the applicants claim as priority:

<u>COUNTRY</u>	<u>APPLICATION NUMBER</u>	<u>MONTH/DAY/YEAR</u>
Japan	2000-355166	November 22, 2000
Japan	2001-114048	April 12, 2001

Certified copies of the corresponding Convention Application(s)

- ☒ are submitted herewith
- ☐ will be submitted prior to payment of the Final Fee
- ☐ were filed in prior application Serial No. filed
- ☐ were submitted to the International Bureau in PCT Application Number  
Receipt of the certified copies by the International Bureau in a timely manner under PCT Rule 17.1(a) has been acknowledged as evidenced by the attached PCT/IB/304.
- ☐ (A) Application Serial No.(s) were filed in prior application Serial No. filed ; and
- ☐ (B) Application Serial No.(s)
- ☐ are submitted herewith
- ☐ will be submitted prior to payment of the Final Fee

Respectfully Submitted,

OBLON, SPIVAK, McCLELLAND,  
MAIER & NEUSTADT, P.C.

Norman F. Oblon

Registration No. 24,618

James D. Hamilton  
Registration No. 28,421



22850

Tel. (703) 413-3000  
Fax. (703) 413-2220  
(OSMMN 10/98)

#11 attachment

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE



別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出 願 年 月 日

Date of Application:

2000年11月22日

出 願 番 号

Application Number:

特願2000-355166

出 願 人

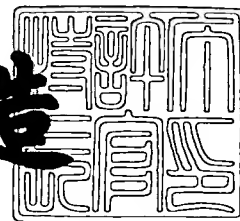
Applicant(s):

花王株式会社

2001年 7月 9日

特 許 庁 長 官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

及 川 耕 造



出証番号 出証特2001-3064058

【書類名】 特許願  
 【整理番号】 P05391211  
 【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12N 9/50  
 C12N 15/00

【発明者】

【住所又は居所】 栃木県芳賀郡市貝町赤羽 2 6 0 6 花王株式会社研究所  
 内

【氏名】 秦田 勇二

【発明者】

【住所又は居所】 栃木県芳賀郡市貝町赤羽 2 6 0 6 花王株式会社研究所  
 内

【氏名】 小川 晃範

【発明者】

【住所又は居所】 栃木県芳賀郡市貝町赤羽 2 6 0 6 花王株式会社研究所  
 内

【氏名】 佐藤 剛

【発明者】

【住所又は居所】 栃木県芳賀郡市貝町赤羽 2 6 0 6 花王株式会社研究所  
 内

【氏名】 荒木 裕行

【発明者】

【住所又は居所】 栃木県芳賀郡市貝町赤羽 2 6 0 6 花王株式会社研究所  
 内

【氏名】 佐伯 勝久

【発明者】

【住所又は居所】 栃木県芳賀郡市貝町赤羽 2 6 0 6 花王株式会社研究所  
 内

【氏名】 川合 修次

【発明者】

【住所又は居所】 栃木県芳賀郡市貝町赤羽 2 6 0 6 花王株式会社研究所  
内

【氏名】 伊藤 進

【特許出願人】

【識別番号】 000000918

【氏名又は名称】 花王株式会社

【代理人】

【識別番号】 100068700

【弁理士】

【氏名又は名称】 有賀 三幸

【選任した代理人】

【識別番号】 100077562

【弁理士】

【氏名又は名称】 高野 登志雄

【選任した代理人】

【識別番号】 100096736

【弁理士】

【氏名又は名称】 中嶋 俊夫

【選任した代理人】

【識別番号】 100101317

【弁理士】

【氏名又は名称】 的場 ひろみ

【選任した代理人】

【識別番号】 100111028

【弁理士】

【氏名又は名称】 山本 博人

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 011752

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 変異アルカリプロテアーゼ

【特許請求の範囲】

【請求項1】 アルカリプロテアーゼの変異体であって、配列番号1の次の  
(a)～(h)：

(a) 66もしくは264位、

(b) 57、101～106、136、193もしくは342位、

(c) 46もしくは205位、

(d) 54、119、138、148もしくは195位、

(e) 247位、

(f) 124位、

(g) 107位、

(h) 257位

から選ばれる位置のアミノ酸残基またはその位置に相当する位置のアミノ酸残基を欠失または他のアミノ酸残基に置換した変異アルカリプロテアーゼ。

【請求項2】 (a)～(h)の位置にあるアミノ酸残基が置換される他のアミノ酸残基が次の群から選ばれたものである請求項1記載の変異アルカリプロテアーゼ。

(a) 位置：グルタミン、アスパラギン酸、セリン、グルタミン酸、アラニン、スレオニン、ロイシン、メチオニン、システイン、バリン、グリシンまたはイソロイシン残基、

(b) 位置：リジン、セリン、グルタミン、フェニルアラニン、バリン、アルギニン、チロシン、ロイシン、イソロイシン、スレオニン、メチオニン、システイン、トリプトファン、アスパラギン酸、グルタミン酸、ヒスチジン、プロリンまたはアラニン残基、

(c) 位置：チロシン、トリプトファン、アラニン、アスパラギン、グルタミン酸、スレオニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、ヒスチジン、セリン、リジン、グルタミン、メチオニンまたはシステイン残基、

(d) 位置：トリプトファン、フェニルアラニン、アラニン、アスパラギン、グ

ルタミン酸、スレオニン、バリン、ヒスチジン、セリン、リジン、グルタミン、メチオニン、グリシン、アスパラギン酸、プロリン、アルギニンまたはシステイン残基、

(e) 位置：トリプトファン、フェニルアラニン、アラニン、アスパラギン、グルタミン酸、スレオニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、ヒスチジン、セリン、グルタミン、メチオニンまたはシステイン残基、

(f) 位置：アラニンまたはリジン残基、

(g) 位置：リジン、アルギニン、アラニンまたはセリン残基、

(h) 位置：バリンまたはイソロイシン残基。

【請求項 3】 変異前のアルカリプロテアーゼが、配列番号 1 に記載のアミノ酸配列またはこれと 6 0 % 以上の相同性を有するアミノ酸配列を有するアルカリプロテアーゼである請求項 1 または 2 記載の変異アルカリプロテアーゼ。

【請求項 4】 変異前のアルカリプロテアーゼが、配列番号 2 ～ 7 から選ばれるアミノ酸配列またはこれと 8 0 % 以上の相同性を有するアルカリプロテアーゼである請求項 1 ～ 3 のいずれか 1 項記載の変異アルカリプロテアーゼ。

【請求項 5】 請求項 1 ～ 4 のいずれか 1 項記載の変異アルカリプロテアーゼをコードする遺伝子。

【請求項 6】 請求項 5 記載の遺伝子を含有する組換えベクター。

【請求項 7】 請求項 6 記載の組換えベクターを含有する形質転換体。

【請求項 8】 宿主が微生物である請求項 7 記載の形質転換体。

【発明の詳細な説明】

【 0 0 0 1 】

【発明の属する技術分野】

本発明は高い比活性を有し、洗浄剤配合酵素として有用な変異アルカリプロテアーゼ及びそれをコードする遺伝子に関する。

【 0 0 0 2 】

【従来の技術及び発明が解決しようとする課題】

プロテアーゼは、衣料用洗剤をはじめとする各種洗浄剤、化粧品、浴用剤、食品改質剤、消化助剤あるいは消炎剤といった医薬品等の多分野で利用されてきた

。その中でも最も大量に工業生産され市場規模が大きいのは洗剤用プロテアーゼであり、多くのプロテアーゼが市販されている。

ところが、衣料等の汚れは蛋白質だけでなく、脂質、固体粒子など複数の成分が含まれていることがほとんどであり、かかる実際の複合汚れに対して洗浄力の高い洗浄剤が望まれている。かかる観点から、本発明者は、高濃度の脂肪酸存在下でもカゼイン分解活性を保持し、蛋白だけでなく皮脂等の汚れのある複合汚れ条件下でも優れた洗浄性を有する分子量約 43,000 のアルカリプロテアーゼを見出し、先に特許出願した (WO 99/18218)。

【0003】

しかし、さらに優れた特性を有するアルカリプロテアーゼが求められていた。

【0004】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは前記アルカリプロテアーゼの変異による新たな酵素の探索を行ってきたが、従来行なわれているズブチリシンに代表されるセリンプロテアーゼと前記アルカリプロテアーゼとは、酵素学的性質が全く異なり、ズブチリシン等の変異箇所は全く参考にならなかった。そしてさらに検討したところ、前記アルカリプロテアーゼの特性を保持し、比活性を向上させるには、特定のアミノ酸残基の変異が必要であることを見出した。

【0005】

すなわち、本発明は、アルカリプロテアーゼの変異体であって、配列番号 1 の次の (a) ~ (h) :

- (a) 66 もしくは 264 位、
- (b) 57、101 ~ 106、136、193 もしくは 342 位、
- (c) 46 もしくは 205 位、
- (d) 54、119、138、148 もしくは 195 位、
- (e) 247 位、
- (f) 124 位、
- (g) 107 位、
- (h) 257 位



から選ばれる位置のアミノ酸残基またはその位置に相当する位置のアミノ酸残基を欠失または他のアミノ酸残基に置換した変異アルカリプロテアーゼ、及びそれをコードする遺伝子を提供するものである。

## 【0006】

## 【発明の実施の形態】

本発明の変異アルカリプロテアーゼの変異を施す前のアルカリプロテアーゼ（親アルカリプロテアーゼということがある）は、野生型又は野生型の変異体であってもよいが、酸化剤耐性を有し、SDS-PAGEによる分子量が43,000 $\pm$ 2,000であることが好ましく、配列番号1に示すアミノ酸配列またはこれと60%以上の相同性を有するアミノ酸配列を有するものがより好ましい。特に好ましくは、酸化剤耐性を有し、アルカリ側（pH8以上）で作用し、かつ安定であり、50℃においてもpH10で10分間処理したとき80%以上の残存性を示し、ジイソプロピルフルオルリン酸（DFP）及びフェニルメタンスルホニルフルオライド（PMSF）で阻害され、SDS-PAGEによる分子量が43,000 $\pm$ 2,000のものが挙げられる。ここで、酸化剤耐性を有するとは、当該アルカリプロテアーゼを50mM過酸化水素（5mM塩化カルシウムを含有）溶液中で、pH10（20mMグリットンロビンソン緩衝液）で、20℃20分間の残存活性（合成基質法）が少なくとも50%以上を保持していることをいう。

## 【0007】

親アルカリプロテアーゼの具体例としては、配列番号1で示されるアミノ酸配列を有するプロテアーゼKP43〔バチルス エスピーKSM-KP43（FERM BP-6532）由来、WO99/18218〕が挙げられ、これと60%以上の相同性を有するものとしては、配列番号2で示されるアミノ酸配列を有するプロテアーゼKP9860〔バチルス エスピーKSM-KP9860（FERM BP-6534）由来、WO99/18218〕、配列番号3で示されるアミノ酸配列を有するプロテアーゼE-1〔バチルス No.D-6（FERM P-1592）由来、JP740710〕、配列番号4で示されるアミノ酸配列を有するプロテアーゼYa〔バチルス エスピーY（FERM BP-1029）由来、JP861210〕、配列番号5で示されるアミノ酸配列を有するプ

ロテアーゼSD521〔バチルス SD521株 (FERM P-11162) 由来、JP910821〕、配列番号6で示されるアミノ酸配列を有するプロテアーゼA-1 (NCIB12289由来、WO8801293)、配列番号7で示されるアミノ酸配列を有するプロテアーゼA-2 (NCIB12513由来、WO8801293) 等が挙げられる。より好ましくは配列番号1~7から選ばれるアミノ酸配列またはこれを80%以上の相同性を有するアルカリプロテアーゼであり、さらに好ましくはこれと90%以上の相同性を有するアルカリプロテアーゼであり、特に95%以上の相同性を有するアルカリプロテアーゼが好ましい。

なお、アミノ酸配列の相同性は、Lipman-Pearson法 (Science, 227,1435,1985) によって計算される。

#### 【0008】

本発明の変異アルカリプロテアーゼの変異は、プロテアーゼKP43の配列番号1で示されるアミノ酸配列の前記(a)~(h)から選ばれる位置のアミノ酸残基または他種アルカリプロテアーゼのアミノ酸配列、例えば配列番号2~7で示されるアミノ酸配列の前記位置に相当する位置のアミノ酸残基を欠失または他のアミノ酸残基に置換することにより得られる。ここで、相当する位置のアミノ酸残基を特定する方法としては、例えば、リップマン-パーソン (Lipman-Pearson) 法等の公知のアルゴリズムを用いてアミノ酸配列を比較することにより行うことができる。プロテアーゼのアミノ酸配列をこのような方法で整列させることにより、相同アミノ酸残基の各プロテアーゼにおける配列中の位置を決めることが可能である。相同位置は、三次元構造中で同位置に存在すると考えられ、対象のプロテアーゼの特異的機能に関して類似した効果を有することが推定できる。

#### 【0009】

(a) 配列番号1の66もしくは264位のアミノ酸残基はアスパラギン残基である。ここで、その位置に相当する位置のアミノ酸残基は、上記の方法を用いることにより、例えば配列番号3においてはそれぞれ66位、263位のアスパラギン酸基というように特定することができる。当該アミノ酸残基は、グルタミン、アスパラギン酸、セリン、グルタミン酸、アラニン、スレオニン、ロイシン

、メチオニン、システイン、バリン、グリシンまたはイソロイシン残基に置換されているのが好ましく、アスパラギン酸、セリンまたはグルタミン酸に置換されているのが特に好ましい。さらには、66位または66位に相当するアミノ酸残基がアスパラギン酸残基に及び264位または264位に相当するアミノ酸残基がセリン残基に置換されているのが好ましい。

## 【0010】

(b) 配列番号1の57、101～106、136、193もしくは342位のアミノ酸残基はグリシン残基である。当該アミノ酸残基は、リジン、セリン、グルタミン、フェニルアラニン、バリン、アルギニン、チロシン、ロイシン、イソロイシン、スレオニン、メチオニン、システイン、トリプトファン、アスパラギン酸、グルタミン酸、ヒスチジン、プロリンまたはアラニン残基に置換されているのが好ましい。特に、57位、136位、193位、342位またはこれらに相当するアミノ酸残基がアラニン残基と、または103位またはこれに相当するアミノ酸残基がアルギニン残基と置換されているのが好ましい。

## 【0011】

(c) 配列番号1の46もしくは205位のアミノ酸残基はフェニルアラニン残基である。当該アミノ酸残基は、チロシン、トリプトファン、アラニン、アスパラギン、グルタミン酸、スレオニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、ヒスチジン、セリン、リジン、グルタミン、メチオニンまたはシステイン残基に置換されているのが好ましい。特に46位またはこれに相当するアミノ酸残基がロイシン残基に置換されているのが好ましい。

## 【0012】

(d) 配列番号1の54、119、138、148もしくは195位のアミノ酸残基はチロシン残基である。当該アミノ酸残基は、トリプトファン、フェニルアラニン、アラニン、アスパラギン、グルタミン酸、スレオニン、バリン、ヒスチジン、セリン、グルタミン、メチオニン、グリシン、アスパラギン酸、プロリン、リジン、アルギニンまたはシステイン残基に置換されているのが好ましい。特に195位またはこれに相当するアミノ酸残基がアラニン、アスパラギン酸、グルタミン酸、グルタミン、バリン、トリプトファン、グリシン、リジン、スレ

オニン、メチオニン、システイン、フェニルアラニン、プロリン、セリン、アルギニン、アスパラギンまたはヒスチジン残基に置換されているのが好ましい。

## 【0013】

(e) 配列番号1の247位のアミノ酸残基はリジン残基である。当該アミノ酸残基は、トリプトファン、フェニルアラニン、アラニン、アスパラギン、グルタミン酸、スレオニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、ヒスチジン、セリン、グルタミン、メチオニンまたはシステインに置換されているのが好ましい。247位またはこれに相当するアミノ酸残基がアルギニンまたはスレオニンに置換されているのが好ましい。

## 【0014】

(f) 配列番号1の124位のアミノ酸残基はアルギニン残基である。当該124位またはこれに相当するアミノ酸残基は、アラニンまたはリジン残基に置換されているのが好ましい。

## 【0015】

(g) 配列番号1の107位のアミノ酸残基はロイシン残基である。当該アミノ酸残基は、リジン、アルギニン、アラニンまたはセリン残基に置換されているのが好ましい。特に107位またはこれに相当するアミノ酸残基がリジン残基に置換されているのが好ましい。

## 【0016】

(h) 配列番号1の257位のアミノ酸残基はアラニン残基である。当該アミノ酸残基は、バリンまたはイソロイシン残基に置換されているのが好ましい。特に257位またはこれに相当するアミノ酸残基がバリン残基に置換されているのが好ましい。

## 【0017】

プロテアーゼKP43のアミノ酸配列（配列番号1）の(a)～(h)位に相当する位置及びアミノ酸残基の具体例を、本発明で好ましい親アルカリプロテアーゼとして用いられるもので示す（表1）。

## 【0018】

【表 1】

プロテアーゼ	KP43	KP9860	E-1	Ya	SD521	A-1	A-2
配列番号	1	2	3	4	5	6	7
(a)	66Asn 264Asn	66Asn 264Asn	66Asn 263Asn	66Asn 263Asn	66Asn 263Asn	66Asn 264Asn	66Asn 263Asn
(b)	57Gly 101Gly 102Gly 103Gly 105Gly 106Gly 136Gly 193Gly 342Gly	57Gly 101Ser 102Gly 103Gly 105Gly 106Gly 136Gly 193Gly 342Gly	56Gly 100Ser 101Gly 102Gly 104Gly 105Gly 135Gly 192Gly 341Gly	56Gly 100Ser 101Gly 102Gly 104Gly 105Gly 135Gly 192Gly 341Gly	56Gly 100Ser 101Gly 102Gly 104Gly 105Gly 135Gly 192Gly 341Gly	57Gly 101Asn 102Gly 103Gly 105Gly 106Gly 136Gly 193Gly 342Gly	56Gly 100Gly 101Gly 102Gly 104Gly 105Gly 135Gly 192Gly 341Gly
(c)	46Phe 205Phe	46Phe 205Phe	46Phe 204Phe	46Phe 204Phe	46Phe 204Phe	46Phe 205Phe	46Phe 204Phe
(d)	195Tyr	195Tyr	194Ile	194Ile	194Leu	195Tyr	194Tyr
(e)	247Lys	247Lys	246Lys	246Lys	246Lys	247Lys	246Lys
(f)	124Arg	124Arg	123Arg	123Arg	123Arg	124Arg	123Arg
(g)	107Leu	107Leu	106Leu	106Leu	106Leu	107Leu	106Leu
(h)	257Ala	257Ala	256Ala	256Ala	256Ala	257Ala	256Ala

## 【0019】

また、配列番号1の30位またはこれに相当するアスパラギン酸残基や、130位またはこれに相当するトリプトファン残基は変異させないことがプロテアーゼ活性維持の点から好ましい。

## 【0020】

また、変異は2個所以上のアミノ酸残基に対して行ってもよい。

## 【0021】

本発明の変異プロテアーゼは、クローニングされた親アルカリプロテアーゼをコードする遺伝子に対して変異を与え、得られた変異遺伝子を用いて適当な宿主を形質転換し、当該組換え宿主を培養することにより得られる。親アルカリプロテアーゼをコードする遺伝子のクローニングは、一般的な遺伝子組換え技術を用いればよく、例えばWO99/18218、JP901128、WO98/56

9 2 7 記載の方法に従って行えばよい。

【 0 0 2 2 】

親アルカリプロテアーゼをコードする遺伝子の変異手段としては、一般的に行われているランダム変異や部異特異的変異の方法がいずれも採用できる。より具体的には、例えば宝酒造社のSite-Directed Mutagenesis System Mutan-Super Express Kmキット等を用いて行うことができる。また、リコンビナントPCR (polymerase chain reaction) 法 (PCR protocols, Academic press, New York, 1990) を用いることによって、遺伝子の任意の配列を他の遺伝子の該任意の配列に相当する配列と置換することが可能である。

【 0 0 2 3 】

得られた変異遺伝子を用いた本発明変異プロテアーゼの生産方法は、例えば当該変異遺伝子を安定に増幅できるDNAベクターに連結させる、あるいは当該変異遺伝子を安定に維持できる染色体DNA上に導入させるなどの方法で本発明の変異プロテアーゼをコードするDNAを安定に増幅し、さらに該遺伝子を安定にかつ効率よく発現させることが可能である宿主に導入させ、変異プロテアーゼを生産させる方法が採用できる。この条件を満たす宿主としては例えばバチルス属細菌、大腸菌、カビ、酵母、放線菌などが挙げられる。

【 0 0 2 4 】

かくして得られる本発明の変異プロテアーゼは、比活性が親アルカリプロテアーゼに比べて向上している以外は、親アルカリプロテアーゼの特性を保持している。すなわち、本発明の変異プロテアーゼは、高級脂肪酸によってカゼイン分解活性の阻害を受けず、SDS-PAGEによる分子量が43,000±2,000であり、アルカリ側で活性を有する。例えば、配列番号1のアミノ酸配列を有するプロテアーゼを親株とする変異プロテアーゼは、下記の理化学的性質を有する。

(i) 作用pH範囲：

pH4～13の広い範囲で作用し、pH6～12で最適pH活性値の80%以上を示す。

(ii) 安定pH範囲：

4 0℃、3 0 分の処理条件で p H 6 ~ 1 1 の範囲で安定である。

(iii) 等電点：

8. 9 ~ 9. 1 付近。

(iv) 脂肪酸の影響：

オレイン酸によってカゼイン分解活性の阻害を受けない。

【 0 0 2 5 】

従って、本発明の変異プロテアーゼは、各種洗浄剤組成物配合用酵素として有用である。

【 0 0 2 6 】

【実施例】

(プロテアーゼ活性測定法)

(1) 合成基質法

基質である Glt-Ala-Ala-Pro-Leu(A-A-P-L) からなる合成ペプチドを用いて分解速度を測定した。すなわち、各被評価酵素と 3 mM の Glt-A-A-P-L-pNA (ペプチド研究所社製) を含む 5 0 mM ホウ酸 / K C l 緩衝液 (p H 1 0. 5) を、1 0 ~ 3 0℃ で 1 0 ~ 3 0 分間恒温し、4 2 0 nm の吸光度を定時的に測定した。ペプチド分解活性は単位時間あたりの 4 2 0 nm 吸光度の増加率から求めた。蛋白質の定量はバイオラッド社製のプロテインアッセイキットを用いて行った。

(2) 天然基質法

カゼイン 1 % (w / v) を含む 5 0 mM ホウ酸緩衝液 (p H 1 0) 1. 0 mL を 3 0℃ で 5 分間保温した後、0. 1 mL の酵素溶液を加え、1 5 分間反応を行う。反応停止液 (0. 1 1 M トリクロロ酢酸 - 0. 2 2 M 酢酸ナトリウム - 0. 3 3 M 酢酸) を 2. 0 mL 加え、室温で 3 0 分間放置したのち、濾過を行い、濾液中の酸可溶蛋白質を Lowry らの方法の変法によって定量した。すなわち、濾液にアルカリ性銅溶液 [ 1 % 酒石酸ナトリウム・カリウム : 1 % 硫酸銅 : 1 % 炭酸ナトリウム = 1 : 1 : 1 0 0 ] を 2. 5 mL 添加して室温で 1 0 分間放置後、希釈フェノール液 (フェノール試薬 (関東化学) をイオン交換水で 2 倍希釈) 0. 2 5 mL を添加して 3 0 分間 3 0℃ で保温したのち、6 6 0 nm における吸光度を測定した。酵素 1 単位は、上記反応にて 1 分間に 1 mmol のチロシンに相当する酸可溶性蛋白分

解物を遊離させるのに必要な酵素量とした。

# 【0027】

## 実施例 1

プロテアーゼ構造遺伝子の終止コドンまでを含む約 2.0 kb の範囲に対しランダムに変異を与えることとした。先ず、本 2.0 kb を増幅できるプライマーを用い PCR を行った。PCR 反応液は鋳型 DNA を 5 ng、リン酸化プライマーを 20 pmol、各 dNTP を 20 nmol、1  $\mu$ mol の Tris/HCl (pH 8.3)、5  $\mu$ mol の KCl、0.15  $\mu$ mol の  $MgCl_2$ 、そして 2.5 U Taq DNA ポリメラーゼを含有し、最終液量を 100  $\mu$ L とした。PCR 温度条件は、94  $^{\circ}C$  において 5 分間放置し鋳型を変性させた後、94  $^{\circ}C$  で 1 分間、55  $^{\circ}C$  で 1 分間、72  $^{\circ}C$  で 1.5 分間を 1 サイクルとしてこれを 30 サイクル行った。PCR product purification Kit (ベーリンガー社) によって PCR 産物を精製し 100  $\mu$ L の滅菌水で溶出させた。引き続き、1  $\mu$ L の溶出液を使用して 2 回目の PCR を行った。PCR の条件は鋳型 DNA 以外は全て 1 回目の PCR 条件と同じである。2 回目の PCR 後に 1 回目と同様に PCR 産物を精製し 100  $\mu$ L の滅菌水で溶出させた。

# 【0028】

増幅 DNA 断片のベクターへの組み込みは TaKaRa 社製の LATaq を用いたポリメラーゼ反応による方法によって行った。詳細に説明すると、2 回目の精製溶出液 35  $\mu$ L に LATaq 用のバッファー (10 倍濃縮液) を 5  $\mu$ L、dNTP 溶液を 8  $\mu$ L、LATaq DNA ポリメラーゼを 0.5  $\mu$ L、さらに鋳型としてプラスミド pHA64TS (発現ベクター pHA64 にプロテアーゼ構造遺伝子を連結) を 20 ng 添加後、最終液量を 50  $\mu$ L にし、94  $^{\circ}C$  1 分間、55  $^{\circ}C$  1 分間、72  $^{\circ}C$  4 分間を 30 サイクルの条件で PCR 反応を行った。その後エタノール沈澱によって PCR 産物を回収した。この PCR 産物はプライマー位置の 5' 側にニックを有するプラスミドの形状を成しており、このニック部分を連結させるために、さらに T4 リガーゼ (TaKaRa 社) によるリガーゼ反応処理を行った。

# 【0029】

次に、同リガーゼ反応液 10  $\mu$ L を用いて *Bacillus subtilis* ISW1214



株の形質転換を行ったところ約  $4 \times 10^5$  個の形質転換体が取得された。そこで ISW1214 株の形質転換体をスキムミルク含有培地（スキムミルク 1%、バクトトリプトン 1%、塩化ナトリウム 1%、酵母エキス 0.5%、寒天 1.5%、テトラサイクリン  $7.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ ）上に生育させ、プロテアーゼ分泌量を反映していると考えられるハローの形成状態を観察した。その結果、野生型プラスミドによる形質転換体よりも明らかに大きなハローを形成する形質転換体を検出した。

## 【0030】

## 実施例 2

実施例 1 で得られた変異プロテアーゼの合成基質法または天然基質法によるプロテアーゼ活性の測定結果を図 1 に示す。本発明の変異アルカリプロテアーゼは高活性であった。

## 【0031】

## 【発明の効果】

本発明によれば、高濃度の脂肪酸存在下でも活性を有し、かつ比活性が高く、洗浄剤配合用酵素として有用な変異アルカリプロテアーゼが提供できる。

## 【0032】

## 【配列表】

## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; KAO CORPORATION

&lt;120&gt; mutant alkaline protease

&lt;130&gt; P05391211

&lt;160&gt; 7

&lt;170&gt; PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 434

<212> PRT

<213> Bacillus sp.

<400> 1

Asn Asp Val Ala Arg Gly Ile Val Lys Ala Asp Val Ala Gln Ser Ser

1 5 10 15

Tyr Gly Leu Tyr Gly Gln Gly Gln Ile Val Ala Val Ala Asp Thr Gly

20 25 30

Leu Asp Thr Gly Arg Asn Asp Ser Ser Met His Glu Ala Phe Arg Gly

35 40 45

Lys Ile Thr Ala Leu Tyr Ala Leu Gly Arg Thr Asn Asn Ala Asn Asp

50 55 60

Thr Asn Gly His Gly Thr His Val Ala Gly Ser Val Leu Gly Asn Gly

65 70 75 80

Ser Thr Asn Lys Gly Met Ala Pro Gln Ala Asn Leu Val Phe Gln Ser

85 90 95

Ile Met Asp Ser Gly Gly Gly Leu Gly Gly Leu Pro Ser Asn Leu Gln

100 105 110

Thr Leu Phe Ser Gln Ala Tyr Ser Ala Gly Ala Arg Ile His Thr Asn

115 120 125

Ser Trp Gly Ala Ala Val Asn Gly Ala Tyr Thr Thr Asp Ser Arg Asn

130

135

140

Val Asp Asp Tyr Val Arg Lys Asn Asp Met Thr Ile Leu Phe Ala Ala

145

150

155

160

Gly Asn Glu Gly Pro Asn Gly Gly Thr Ile Ser Ala Pro Gly Thr Ala

165

170

175

Lys Asn Ala Ile Thr Val Gly Ala Thr Glu Asn Leu Arg Pro Ser Phe

180

185

190

Gly Ser Tyr Ala Asp Asn Ile Asn His Val Ala Gln Phe Ser Ser Arg

195

200

205

Gly Pro Thr Lys Asp Gly Arg Ile Lys Pro Asp Val Met Ala Pro Gly

210

215

220

Thr Phe Ile Leu Ser Ala Arg Ser Ser Leu Ala Pro Asp Ser Ser Phe

225

230

235

240

Trp Ala Asn His Asp Ser Lys Tyr Ala Tyr Met Gly Gly Thr Ser Met

245

250

255

Ala Thr Pro Ile Val Ala Gly Asn Val Ala Gln Leu Arg Glu His Phe

260

265

270

Val Lys Asn Arg Gly Ile Thr Pro Lys Pro Ser Leu Leu Lys Ala Ala

275	280	285
Leu Ile Ala Gly Ala Ala Asp Ile Gly Leu Gly Tyr Pro Asn Gly Asn		
290	295	300
Gln Gly Trp Gly Arg Val Thr Leu Asp Lys Ser Leu Asn Val Ala Tyr		
305	310	315 320
Val Asn Glu Ser Ser Ser Leu Ser Thr Ser Gln Lys Ala Thr Tyr Ser		
325	330	335
Phe Thr Ala Thr Ala Gly Lys Pro Leu Lys Ile Ser Leu Val Trp Ser		
340	345	350
Asp Ala Pro Ala Ser Thr Thr Ala Ser Val Thr Leu Val Asn Asp Leu		
355	360	365
Asp Leu Val Ile Thr Ala Pro Asn Gly Thr Gln Tyr Val Gly Asn Asp		
370	375	380
Phe Thr Ser Pro Tyr Asn Asp Asn Trp Asp Gly Arg Asn Asn Val Glu		
385	390	395 400
Asn Val Phe Ile Asn Ala Pro Gln Ser Gly Thr Tyr Thr Ile Glu Val		
405	410	415
Gln Ala Tyr Asn Val Pro Val Gly Pro Gln Thr Phe Ser Leu Ala Ile		
420	425	430

Val Asn

[ 0 0 3 3 ]

<210> 2

<211> 434

<212> PRT

<213> Bacillus sp.

<400> 2

Asn Asp Val Ala Arg Gly Ile Val Lys Ala Asp Val Ala Gln Ser Ser

1

5

10

15

Tyr Gly Leu Tyr Gly Gln Gly Gln Ile Val Ala Val Ala Asp Thr Gly

20

25

30

Leu Asp Thr Gly Arg Asn Asp Ser Ser Met His Glu Ala Phe Arg Gly

35

40

45

Lys Ile Thr Ala Leu Tyr Ala Leu Gly Arg Thr Asn Asn Ala Asn Asp

50

55

60

Thr Asn Gly His Gly Thr His Val Ala Gly Ser Val Leu Gly Asn Gly

65

70

75

80

Ala Thr Asn Lys Gly Met Ala Pro Gln Ala Asn Leu Val Phe Gln Ser

85

90

95

Ile Met Asp Ser Ser Gly Gly Leu Gly Gly Leu Pro Ser Asn Leu Gln

100

105

110

Thr Leu Phe Ser Gln Ala Phe Ser Ala Gly Ala Arg Ile His Thr Asn  
115 120 125

Ser Trp Gly Ala Ala Val Asn Gly Ala Tyr Thr Thr Asp Ser Arg Asn  
130 135 140

Val Asp Asp Tyr Val Arg Lys Asn Asp Met Thr Ile Leu Phe Ala Ala  
145 150 155 160

Gly Asn Glu Gly Pro Asn Gly Gly Thr Ile Ser Ala Pro Gly Thr Ala  
165 170 175

Lys Asn Ala Ile Thr Val Gly Ala Thr Glu Asn Leu Arg Pro Ser Phe  
180 185 190

Gly Ser Tyr Ala Asp Asn Ile Asn His Val Ala Gln Phe Ser Ser Arg  
195 200 205

Gly Pro Thr Lys Asp Gly Arg Ile Lys Pro Asp Val Met Ala Pro Gly  
210 215 220

Thr Tyr Ile Leu Ser Ala Arg Ser Ser Leu Ala Pro Asp Ser Ser Phe  
225 230 235 240

Trp Ala Asn His Asp Ser Lys Tyr Ala Tyr Met Gly Gly Thr Ser Met  
245 250 255

Ala Thr Pro Ile Val Ala Gly Asn Val Ala Gln Leu Arg Glu His Phe

260

265

270

Val Lys Asn Arg Gly Ile Thr Pro Lys Pro Ser Leu Leu Lys Ala Ala

275

280

285

Leu Ile Ala Gly Ala Ala Asp Val Gly Leu Gly Tyr Pro Asn Gly Asn

290

295

300

Gln Gly Trp Gly Arg Val Thr Leu Asp Lys Ser Leu Asn Val Ala Tyr

305

310

315

320

Val Asn Glu Ser Ser Ala Leu Ser Thr Ser Gln Lys Ala Thr Tyr Thr

325

330

335

Phe Thr Ala Thr Ala Gly Lys Pro Leu Lys Ile Ser Leu Val Trp Ser

340

345

350

Asp Ala Pro Ala Ser Thr Thr Ala Ser Val Thr Leu Val Asn Asp Leu

355

360

365

Asp Leu Val Ile Thr Ala Pro Asn Gly Thr Arg Tyr Val Gly Asn Asp

370

375

380

Phe Ser Ala Pro Phe Asp Asn Asn Trp Asp Gly Arg Asn Asn Val Glu

385

390

395

400

Asn Val Phe Ile Asn Ser Pro Gln Ser Gly Thr Tyr Thr Ile Glu Val

405

410

415

Gln Ala Tyr Asn Val Pro Val Gly Pro Gln Asn Phe Ser Leu Ala Ile

420

425

430

Val Asn

【 0 0 3 4 】

<210> 3

<211> 433

<212> PRT

<213> Bacillus sp.

<400> 3

Asn Asp Val Ala Arg Gly Ile Val Lys Ala Asp Val Ala Gln Asn Asn

1

5

10

15

Tyr Gly Leu Tyr Gly Gln Gly Gln Val Val Ala Val Ala Asp Thr Gly

20

25

30

Leu Asp Thr Gly Arg Asn Asp Ser Ser Met His Glu Ala Phe Arg Gly

35

40

45

Lys Ile Thr Ala Leu Tyr Ala Leu Gly Arg Thr Asn Asn Ala Asn Asp

50

55

60

Pro Asn Gly His Gly Thr His Val Ala Gly Ser Val Leu Gly Asn Ala

65

70

75

80

Leu Asn Lys Gly Met Ala Pro Gln Ala Asn Leu Val Phe Gln Ser Ile

85

90

95



Met Asp Ser Ser Gly Gly Leu Gly Gly Leu Pro Ser Asn Leu Asn Thr

100

105

110

Leu Phe Ser Gln Ala Trp Asn Ala Gly Ala Arg Ile His Thr Asn Ser

115

120

125

Trp Gly Ala Pro Val Asn Gly Ala Tyr Thr Ala Asn Ser Arg Gln Val

130

135

140

Asp Glu Tyr Val Arg Asn Asn Asp Met Thr Val Leu Phe Ala Ala Gly

145

150

155

160

Asn Glu Gly Pro Asn Ser Gly Thr Ile Ser Ala Pro Gly Thr Ala Lys

165

170

175

Asn Ala Ile Thr Val Gly Ala Thr Glu Asn Tyr Arg Pro Ser Phe Gly

180

185

190

Ser Ile Ala Asp Asn Pro Asn His Ile Ala Gln Phe Ser Ser Arg Gly

195

200

205

Ala Thr Arg Asp Gly Arg Ile Lys Pro Asp Val Thr Ala Pro Gly Thr

210

215

220

Phe Ile Leu Ser Ala Arg Ser Ser Leu Ala Pro Asp Ser Ser Phe Trp

225

230

235

240

Ala Asn Tyr Asn Ser Lys Tyr Ala Tyr Met Gly Gly Thr Ser Met Ala

245

250

255

Thr Pro Ile Val Ala Gly Asn Val Ala Gln Leu Arg Glu His Phe Ile

260

265

270

Lys Asn Arg Gly Ile Thr Pro Lys Pro Ser Leu Ile Lys Ala Ala Leu

275

280

285

Ile Ala Gly Ala Thr Asp Val Gly Leu Gly Tyr Pro Ser Gly Asp Gln

290

295

300

Gly Trp Gly Arg Val Thr Leu Asp Lys Ser Leu Asn Val Ala Tyr Val

305

310

315

320

Asn Glu Ala Thr Ala Leu Thr Thr Gly Gln Lys Ala Thr Tyr Ser Phe

325

330

335

Gln Thr Gln Ala Gly Lys Pro Leu Lys Ile Ser Leu Val Trp Thr Asp

340

345

350

Ala Pro Gly Ser Thr Thr Ala Ser Tyr Thr Leu Val Asn Asp Leu Asp

355

360

365

Leu Val Ile Thr Ala Pro Asn Gly Gln Lys Tyr Val Gly Asn Asp Phe

370

375

380

Ser Tyr Pro Tyr Asp Asn Asn Trp Asp Gly Arg Asn Asn Val Glu Asn

385

390

395

400

Val Phe Ile Asn Ala Pro Gln Ser Gly Thr Tyr Thr Ile Glu Val Gln

405

410

415

Ala Tyr Asn Val Pro Ser Gly Pro Gln Arg Phe Ser Leu Ala Ile Val

420

425

430

His

【 0 0 3 5 】

<210> 4

<211> 433

<212> PRT

<213> Bacillus sp.

<400> 4

Asn Asp Val Ala Arg Gly Ile Val Lys Ala Asp Val Ala Gln Asn Asn

1

5

10

15

Tyr Gly Leu Tyr Gly Gln Gly Gln Val Val Ala Val Ala Asp Thr Gly

20

25

30

Leu Asp Thr Gly Arg Asn Asp Ser Ser Met His Glu Ala Phe Arg Gly

35

40

45

Lys Ile Thr Ala Leu Tyr Ala Leu Gly Arg Thr Asn Asn Ala Ser Asp

50

55

60

Pro Asn Gly His Gly Thr His Val Ala Gly Ser Val Leu Gly Asn Ala

65

70

75

80

Leu Asn Lys Gly Met Ala Pro Gln Ala Asn Leu Val Phe Gln Ser Ile

85

90

95

Met Asp Ser Ser Gly Gly Leu Gly Gly Leu Pro Ser Asn Leu Asn Thr

100

105

110

Leu Phe Ser Gln Ala Trp Asn Ala Gly Ala Arg Ile His Thr Asn Ser

115

120

125

Trp Gly Ala Pro Val Asn Gly Ala Tyr Thr Ala Asn Ser Arg Gln Val

130

135

140

Asp Glu Tyr Val Arg Asn Asn Asp Met Thr Val Leu Phe Ala Ala Gly

145

150

155

160

Asn Glu Gly Pro Asn Ser Gly Thr Ile Ser Ala Pro Gly Thr Ala Lys

165

170

175

Asn Ala Ile Thr Val Gly Ala Thr Glu Asn Tyr Arg Pro Ser Phe Gly

180

185

190

Ser Ile Ala Asp Asn Pro Asn His Ile Ala Gln Phe Ser Ser Arg Gly

195

200

205

Ala Thr Arg Asp Gly Arg Ile Lys Pro Asp Val Thr Ala Pro Gly Thr

210

215

220

Phe Ile Leu Ser Ala Arg Ser Ser Leu Ala Pro Asp Ser Ser Phe Trp

225

230

235

240

Ala Asn Tyr Asn Ser Lys Tyr Ala Tyr Met Gly Gly Thr Ser Met Ala

245

250

255

Thr Pro Ile Val Ala Gly Asn Val Ala Gln Leu Arg Glu His Phe Ile

260

265

270

Lys Asn Arg Gly Ile Thr Pro Lys Pro Ser Leu Ile Lys Ala Ala Leu

275

280

285

Ile Ala Gly Ala Thr Asp Val Gly Leu Gly Tyr Pro Asn Gly Asp Gln

290

295

300

Gly Trp Gly Arg Val Thr Leu Asn Lys Ser Leu Asn Val Ala Tyr Val

305

310

315

320

Asn Glu Ala Thr Ala Leu Ala Thr Gly Gln Lys Ala Thr Tyr Ser Phe

325

330

335

Gln Ala Gln Ala Gly Lys Pro Leu Lys Ile Ser Leu Val Trp Thr Asp

340

345

350

Ala Pro Gly Ser Thr Thr Ala Ser Tyr Thr Leu Val Asn Asp Leu Asp

355

360

365

Leu Val Ile Thr Ala Pro Asn Gly Gln Lys Tyr Val Gly Asn Asp Phe

370

375

380

Ser Tyr Pro Tyr Asp Asn Asn Trp Asp Gly Arg Asn Asn Val Glu Asn

385

390

395

400

Val Phe Ile Asn Ala Pro Gln Ser Gly Thr Tyr Ile Ile Glu Val Gln  
405 410 415

Ala Tyr Asn Val Pro Ser Gly Pro Gln Arg Phe Ser Leu Ala Ile Val  
420 425 430

His

【 0 0 3 6 】

<210> 5

<211> 433

<212> PRT

<213> Bacillus sp.

<400> 5

Asn Asp Val Ala Arg Gly Ile Val Lys Ala Asp Val Ala Gln Asn Asn  
1 5 10 15

Tyr Gly Leu Tyr Gly Gln Gly Gln Val Val Ala Val Ala Asp Thr Gly  
20 25 30

Leu Asp Thr Gly Arg Asn Asp Ser Ser Met His Glu Ala Phe Arg Gly  
35 40 45

Lys Ile Thr Ala Leu Tyr Ala Leu Gly Arg Thr Asn Asn Ala Asn Asp  
50 55 60

Pro Asn Gly His Gly Thr His Val Ala Gly Ser Val Leu Gly Asn Ala  
65 70 75 80

Leu Asn Lys Gly Met Ala Pro Gln Ala Asn Leu Val Phe Gln Ser Ile

85

90

95

Met Asp Ser Ser Gly Gly Leu Gly Gly Leu Pro Ser Asn Leu Asn Thr

100

105

110

Leu Phe Ser Gln Ala Trp Asn Ala Gly Ala Arg Ile His Thr Asn Ser

115

120

125

Trp Gly Ala Pro Val Asn Gly Ala Tyr Thr Ala Asn Ser Arg Gln Val

130

135

140

Asp Glu Tyr Val Arg Asn Asn Asp Met Thr Val Leu Phe Ala Ala Gly

145

150

155

160

Asn Glu Gly Pro Asn Ser Gly Thr Ile Ser Ala Pro Gly Thr Ala Lys

165

170

175

Asn Ala Ile Thr Val Gly Ala Thr Glu Asn Tyr Arg Pro Ser Phe Gly

180

185

190

Ser Leu Ala Asp Asn Pro Asn His Ile Ala Gln Phe Ser Ser Arg Gly

195

200

205

Ala Thr Arg Asp Gly Arg Ile Lys Pro Asp Val Thr Ala Pro Gly Thr

210

215

220

Phe Ile Leu Ser Ala Arg Ser Ser Leu Ala Pro Asp Ser Ser Phe Trp

225	230	235	240
Ala Asn Tyr Asn Ser Lys Tyr Ala Tyr Met Gly Gly Thr Ser Met Ala			
245	250	255	
Thr Pro Ile Val Ala Gly Asn Val Ala Gln Leu Arg Glu His Phe Ile			
260	265	270	
Lys Asn Arg Gly Ile Thr Pro Lys Pro Ser Leu Ile Lys Ala Ala Leu			
275	280	285	
Ile Ala Gly Ala Thr Asp Val Gly Leu Gly Tyr Pro Ser Gly Asp Gln			
290	295	300	
Gly Trp Gly Arg Val Thr Leu Asp Lys Ser Leu Asn Val Ala Tyr Val			
305	310	315	320
Asn Glu Ala Thr Ala Leu Ala Thr Gly Gln Lys Ala Thr Tyr Ser Phe			
325	330	335	
Gln Ala Gln Ala Gly Lys Pro Leu Lys Ile Ser Leu Val Trp Thr Asp			
340	345	350	
Ala Pro Gly Ser Thr Thr Ala Ser Tyr Thr Leu Val Asn Asp Leu Asp			
355	360	365	
Leu Val Ile Thr Ala Pro Asn Gly Gln Lys Tyr Val Gly Asn Asp Phe			
370	375	380	



Ser Tyr Pro Tyr Asp Asn Asn Trp Asp Gly Arg Asn Asn Val Glu Asn  
385 390 395 400

Val Phe Ile Asn Ala Pro Gln Ser Gly Thr Tyr Thr Ile Glu Val Gln  
405 410 415

Ala Tyr Asn Val Pro Ser Gly Pro Gln Arg Phe Ser Leu Ala Ile Val  
420 425 430

His

【 0 0 3 7 】

<210> 6

<211> 434

<212> PRT

<213> Bacillus sp.

<400> 6

Asn Asp Val Ala Arg Gly Ile Val Lys Ala Asp Val Ala Gln Ser Ser  
1 5 10 15

Tyr Gly Leu Tyr Gly Gln Gly Gln Val Val Ala Val Ala Asp Thr Gly  
20 25 30

Leu Asp Thr Gly Arg Asn Asp Ser Ser Met His Glu Ala Phe Arg Gly  
35 40 45

Lys Ile Thr Ala Ile Tyr Ala Leu Gly Arg Thr Asn Asn Ala Asn Asp  
50 55 60

Pro Asn Gly His Gly Thr His Val Ala Gly Ser Val Leu Gly Asn Gly  
65 70 75 80

Thr Ser Asn Lys Gly Met Ala Pro Gln Ala Asn Leu Val Phe Gln Ser  
85 90 95

Val Met Asp Ser Asn Gly Gly Leu Gly Gly Leu Pro Ser Asn Val Ser  
100 105 110

Thr Leu Phe Ser Gln Ala Tyr Ser Ala Gly Ala Arg Ile His Thr Asn  
115 120 125

Ser Trp Gly Ala Pro Val Asn Gly Ala Tyr Thr Thr Asp Ser Arg Asn  
130 135 140

Val Asp Asp Tyr Val Arg Lys Asn Asp Met Ala Val Leu Phe Ala Ala  
145 150 155 160

Gly Asn Glu Gly Pro Asn Gly Gly Thr Ile Ser Ala Pro Gly Thr Ala  
165 170 175

Lys Asn Ala Ile Thr Val Gly Ala Thr Glu Asn Leu Arg Pro Ser Phe  
180 185 190

Gly Ser Tyr Ala Asp Asn Ile Asn His Val Ala Gln Phe Ser Ser Arg  
195 200 205

Gly Pro Thr Lys Asp Gly Arg Ile Lys Pro Asp Val Met Ala Pro Gly  
210 215 220

Thr Phe Ile Leu Ser Ala Arg Ser Ser Leu Ala Pro Asp Ser Ser Phe  
225 230 235 240

Trp Ala Asn His Asp Ser Lys Tyr Ala Tyr Met Gly Gly Thr Ser Met  
245 250 255

Ala Thr Pro Ile Val Ala Gly Asn Val Ala Gln Leu Arg Glu His Phe  
260 265 270

Ile Lys Asn Arg Gly Ile Thr Pro Lys Pro Ser Leu Leu Lys Ala Ala  
275 280 285

Leu Ile Ala Gly Ala Thr Asp Ile Gly Leu Gly Tyr Pro Ser Gly Asn  
290 295 300

Gln Gly Trp Gly Arg Val Thr Leu Asp Lys Ser Leu Asn Val Ala Phe  
305 310 315 320

Val Asn Glu Thr Ser Ser Leu Ser Thr Asn Gln Lys Ala Thr Tyr Ser  
325 330 335

Phe Thr Ala Gln Ser Gly Lys Pro Leu Lys Ile Ser Leu Val Trp Ser  
340 345 350

Asp Ala Pro Ala Ser Thr Ser Ala Ser Val Thr Leu Val Asn Asp Leu  
355 360 365

Asp Leu Val Ile Thr Ala Pro Asn Gly Thr Lys Tyr Val Gly Asn Asp

370

375

380

Phe Thr Ala Pro Tyr Asp Asn Asn Trp Asp Gly Arg Asn Asn Val Glu

385

390

395

400

Asn Val Phe Ile Asn Ala Pro Gln Ser Gly Thr Tyr Thr Val Glu Val

405

410

415

Gln Ala Tyr Asn Val Pro Gln Gly Pro Gln Ala Phe Ser Leu Ala Ile

420

425

430

Val Asn

【 0 0 3 8 】

<210> 7

<211> 433

<212> PRT

<213> Bacillus sp.

<400> 7

Asn Asp Val Ala Arg Gly Ile Val Lys Ala Asp Val Ala Gln Asn Asn

1

5

10

15

Phe Gly Leu Tyr Gly Gln Gly Gln Ile Val Ala Val Ala Asp Thr Gly

20

25

30

Leu Asp Thr Gly Arg Asn Asp Ser Ser Met His Glu Ala Phe Arg Gly

35

40

45

Lys Ile Thr Ala Leu Tyr Ala Leu Gly Arg Thr Asn Asn Ala Asn Asp

50	55	60
Pro Asn Gly His Gly Thr His Val Ala Gly Ser Val Leu Gly Asn Ala		
65	70	75 80
Thr Asn Lys Gly Met Ala Pro Gln Ala Asn Leu Val Phe Gln Ser Ile		
85	90	95
Met Asp Ser Gly Gly Gly Leu Gly Gly Leu Pro Ala Asn Leu Gln Thr		
100	105	110
Leu Phe Ser Gln Ala Tyr Ser Ala Gly Ala Arg Ile His Thr Asn Ser		
115	120	125
Trp Gly Ala Pro Val Asn Gly Ala Tyr Thr Thr Asp Ser Arg Asn Val		
130	135	140
Asp Asp Tyr Val Arg Lys Asn Asp Met Thr Ile Leu Phe Ala Ala Gly		
145	150	155 160
Asn Glu Gly Pro Gly Ser Gly Thr Ile Ser Ala Pro Gly Thr Ala Lys		
165	170	175
Asn Ala Ile Thr Val Gly Ala Thr Glu Asn Leu Arg Pro Ser Phe Gly		
180	185	190
Ser Tyr Ala Asp Asn Ile Asn His Val Ala Gln Phe Ser Ser Arg Gly		
195	200	205

Pro Thr Arg Asp Gly Arg Ile Lys Pro Asp Val Met Ala Pro Gly Thr

210

215

220

Tyr Ile Leu Ser Ala Arg Ser Ser Leu Ala Pro Asp Ser Ser Phe Trp

225

230

235

240

Ala Asn His Asp Ser Lys Tyr Ala Tyr Met Gly Gly Thr Ser Met Ala

245

250

255

Thr Pro Ile Val Ala Gly Asn Val Ala Gln Leu Arg Glu His Phe Val

260

265

270

Lys Asn Arg Gly Val Thr Pro Lys Pro Ser Leu Leu Lys Ala Ala Leu

275

280

285

Ile Ala Gly Ala Ala Asp Val Gly Leu Gly Phe Pro Asn Gly Asn Gln

290

295

300

Gly Trp Gly Arg Val Thr Leu Asp Lys Ser Leu Asn Val Ala Phe Val

305

310

315

320

Asn Glu Thr Ser Pro Leu Ser Thr Ser Gln Lys Ala Thr Tyr Ser Phe

325

330

335

Thr Ala Gln Ala Gly Lys Pro Leu Lys Ile Ser Leu Val Trp Ser Asp

340

345

350

Ala Pro Gly Ser Thr Thr Ala Ser Leu Thr Leu Val Asn Asp Leu Asp

355

360

365

Leu Val Ile Thr Ala Pro Asn Gly Thr Lys Tyr Val Gly Asn Asp Phe  
 370 375 380

Thr Ala Pro Tyr Asp Asn Asn Trp Asp Gly Arg Asn Asn Val Glu Asn  
 385 390 395 400

Val Phe Ile Asn Ala Pro Gln Ser Gly Thr Tyr Thr Val Glu Val Gln  
 405 410 415

Ala Tyr Asn Val Pro Val Ser Pro Gln Thr Phe Ser Leu Ala Ile Val  
 420 425 430

His

【図面の簡単な説明】

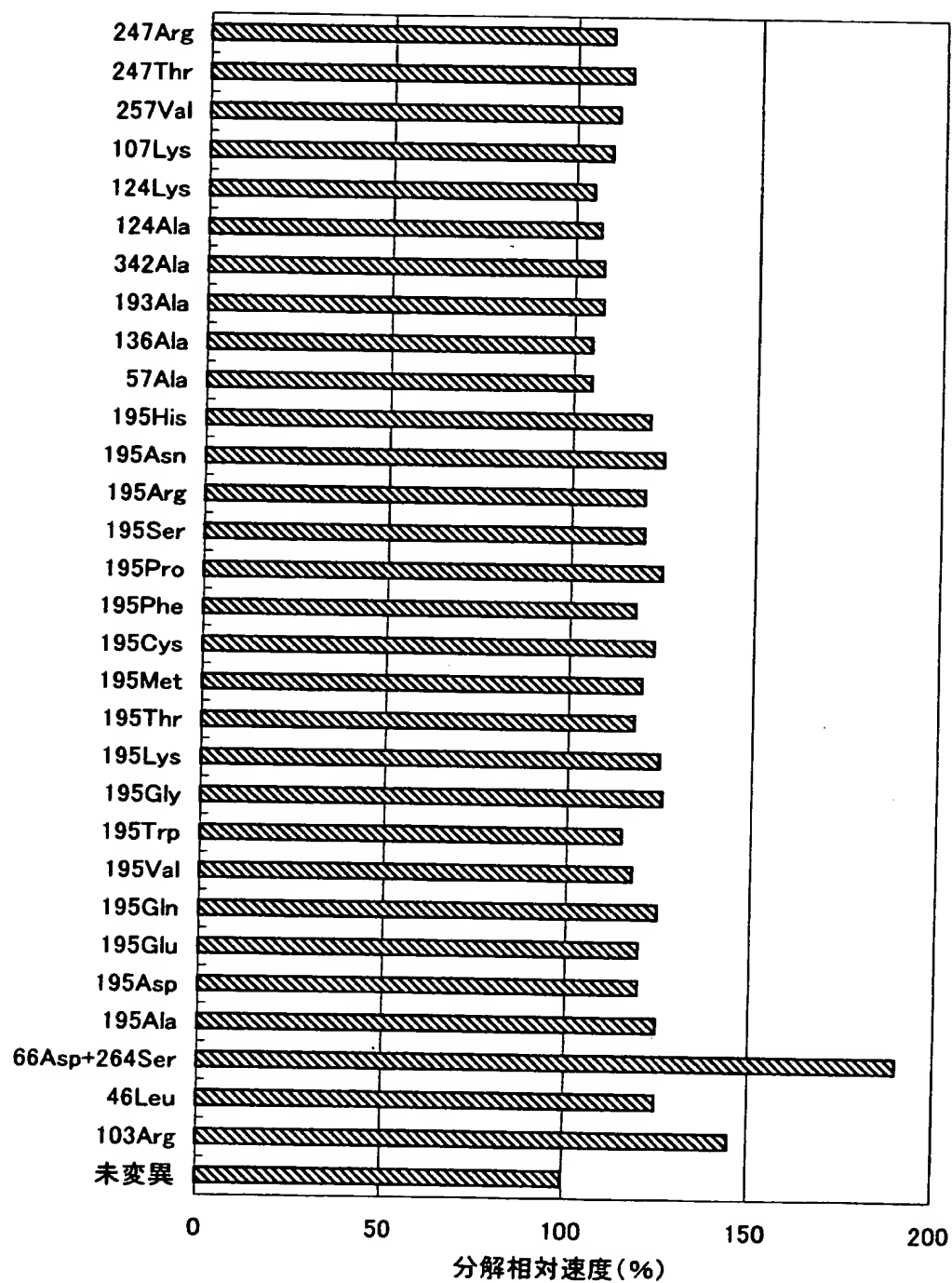
【図 1】

各変異アルカリプロテアーゼのペプチド分解相対速度を示す図である。

【書類名】 図面



【図 1】



(注) 195 位アミノ酸残基変異プロテアーゼは天然基質法、  
他は合成基質法で測定した。

【書類名】 要約書

【要約】

【解決手段】 アルカリプロテアーゼの変異体であって、配列番号1の次の  
(a)～(h) : (a) 66もしくは264位、(b) 57、101～106、  
136、193もしくは342位、  
(c) 46もしくは205位、(d) 54、119、138、148もしくは1  
95位、(e) 247位、(f) 124位、(g) 107位、(h) 257位  
から選ばれる位置のアミノ酸残基またはその位置に相当する位置のアミノ酸残基  
を欠失または他のアミノ酸残基に置換した変異アルカリプロテアーゼ。

【効果】 本発明によれば、高濃度の脂肪酸存在下でも活性を有し、かつ  
比活性が高く、洗浄剤配合用酵素として有用な変異アルカリプロテアーゼが提供  
できる。

【選択図】 なし

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2000-355166
受付番号	50001502556
書類名	特許願
担当官	第五担当上席 0094
作成日	平成12年11月24日

<認定情報・付加情報>

【提出日】	平成12年11月22日
-------	-------------

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000000918]

1. 変更年月日 1990年 8月24日

[変更理由] 新規登録

住 所 東京都中央区日本橋茅場町1丁目14番10号

氏 名 花王株式会社